

BEST AVAILABLE COPY

(19)

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11) Publication
number:

100201585 B1

(43) Date of publication of application:
15.03.1999

(21) Application number: 1019960053685

(71) Applicant:

CHEIL JEDANG
CORPORATION
PARK, MAN KI

(22) Date of filing: 13.11.1996

(72) Inventor:

KANG, SU YEON
KIM, JONG MUN
KIM, NAK DU
KIM, WANG YU
PARK, JEONG IL
PARK, MAN KI

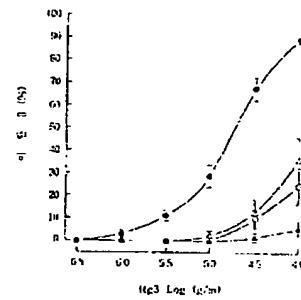
(51) Int. Cl

A61K 31 /575

(54) VASODILATOR COMPOSITION

(57) Abstract:

PURPOSE: A vasodilator composition containing ginsenoside Rg3 and/or Rg5 as active ingredients is provided, which does not destroy endothelium cells unlike common saponin ingredients, so does not have side effects such as hemolysis and toxicity in blood. CONSTITUTION: A process for the preparation of ginseng extract containing ginsenoside Rg3 and/or Rg5 is comprised of: pouring Panax ginseng into a closed container, and heating for 2hrs at 130deg.C; extracting the prepared ginseng in methanol to get methanol extract; distilling methanol to remove, suspending the residue in water, and extracting with ether for 3times; extracting the residual water layer with hydro-saturated butanol for 3times to get saponin-contained butanol extract; drying the butanol extract, and processing chromatography on silicagel column using a mixed solvent of ethylacetate/methanol/water(20:1:1) to get the objective fraction containing ginsenoside Rg3 and/or Rg5. The vasodilator composition contains more than 10%(w/w) of ginsenoside Rg3 and/or Rg5.



COPYRIGHT 2001 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (19961113)

Notification date of refusal decision ()

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (19990225)

Patent registration number (1002015850000)

Date of registration (19990315)

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent ()

Number of trial against decision to refuse ()

Date of requesting trial against decision to refuse ()

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. 6
A61K 31/575(45) 공고일자 1999년06월15일
(11) 공고번호 10-0201585
(24) 등록일자 1999년03월15일

(21) 출원번호	10-1996-0053685	(65) 공개번호	특1997-0025614
(22) 출원일자	1996년11월13일	(43) 공개일자	1997년06월24일
(30) 우선권주장	101995042997	1995년11월22일	대한민국(KR)
(73) 특허권자	제일제당주식회사 손경식 서울특별시 종구 남대문로 5가 500번지 박만기 경기도 성남시 분당구 구미동 66 신원아파트 310동 502호		
(72) 발명자	김낙우 서울특별시 동작구 신대방동 565-21 신대방 우성아파트2차 101동 1101호 박만기 경기도 성남시 분당구 구미동 66 신원아파트 310동 502호 박정일 서울특별시 강남구 일원본동 한솔마을 301동 208호 김종문 서울특별시 송파구 잠실 2동 주공아파트 229-313호 강수연 서울특별시 관악구 신림 2동 120-2 김왕유 서울특별시 송파구 가락동 가락시영아파트 93-306호		
(74) 대리인	김석중 최규팔		

심사관 : 길이용

(54) 혈관이완제 조성물

요약

본 발명은 인삼의 성분중의 하나인 진세노사이드 Rg_3 및/또는 Rg_5 를 활성성분으로서 함유하는 혈관이완제 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르는 조성물의 활성성분인 진세노사이드 Rg

Rg_3 및 Rg_5 는 내피의존적으로 혈관이완작용을 나타내며, 일반적인 사포닌 성분과는 달리 내피세포를 파괴하지 않아 용혈작용이나 어독성 등의 부작용이 없이 사용할 수 있는 안전한 의약성분이다. 진세노사이드 Rg

Rg_3 및 Rg_5 는 수삼, 백삼 등의 인삼식물에는 거의 존재하지 않고 흥삼중에 극미량으로만 존재하는 성분으로, 인삼식물을 110 내지 180°C의 고온에서 0.5 내지 20시간 동안 가열함으로써 그 함량이 현저히 증가한다.

명세서

[발명의 명칭] 혈관이완제 조성물 [도면의 간단한 설명] 제1도는 진세노사이드 Rg_3 를 내피존재하에서 단독투여하였을 때의 혈관이완효과(-○-)를 내피를 제거하고 투여하였을 때(-○-), 내피존재하에서 Rg_3 를 $10^{-6}M$ 의 매틸렌블루(MB)의 병용투여하였을 때(-△-) 및 $10^{-6}M$ 의 L-니트로일기닌(L-NLA)과 병용투여하였을 때(-△-)의 혈관이완효과와 비교하여 나타낸 그래프이다.

● -)를 내피를 제거하고 투여하였을 때(-○-), 내피존재하에서 Rg_3 를 $10^{-6}M$ 의 매틸렌블루(MB)의 병용투여하였을 때(-△-) 및 $10^{-6}M$ 의 L-니트로일기닌(L-NLA)과 병용투여하였을 때(-△-)

▲ -)의 혈관이완효과와 비교하여 나타낸 그래프이다.

제2도는 실시에 7에서 제조한 가공 파낙사다을계 사포닌 분획을 내피존재 하에서 투여하였을 때(-

-) 및 내피를 제거하고 투여하였을 때의 혈관이완효과를 비교하여 나타낸 그래프이다.

제3도는 HUVEC 세포에 대한 진세노사이드 Rg_3 와 용배로 사용한 디메틸설폐사이드(DMSO)의 세포독성 실험결과를 나타낸 그래프로 세포에 DMSO를 가하여 배양하였을 때(-○-) 및 진세노사이드 Rg_3 를 DMSO에 용해시킨 용액을 가하여 배양하였을 때(-

-)의 세포의 생존율을 비교하여 나타낸 그래프이다.

제4도는 진세노사이드 Rg_5 를 내피 존재 하에서 단독투여하였을 때의 혈관이완효과(-○-)를, 내피를 제거하고 투여하였을 때(-

-) 내피존재 하에서 Rg_5 를 $10^{-6}M$ 의 매틸렌블루(MB) 와 병용투여하였을 때(-

-) 및 $10^{-6}M$ 의 L-니트로알기닌(L-NLA)과 병용투여하였을 때(-△-)의 혈관이완효과와 비교하여 나타낸 그래프이다.

제5도는 HUVEC 세포에 대한 진세노사이드 Rg_5 와 용배로 사용한 디메틸설폐사이드(DMSO)의 세포독성 실험결과를 나타낸 그래프로서, 세포에 DMSO를 가하여 배양하였을 때(-

-) 및 진세노사이드 Rg_5 를 DMSO에 용해시킨 용액을 가하여 배양하였을 때(-

-)의 세포의 생존율을 비교하여 나타낸 그래프이다.

[발명의 상세한 설명]본 발명은 인삼의 특정 유효성분을 활성성분으로서 함유하는 혈관이완제 조성물에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 인삼의 사포닌계 성분중의 하나인 진세노사이드 Rg_3 및/또는 Rg_5 를 활성성분으로 함유하는 혈관이완제 조성물에 관한 것이다.

인삼은 고래로부터 가장 대표적인 자양강장제로서 널리 사용되어 오고 있으며, 최근에는 그 성분과 약효에 대한 많은 연구결과가 보고되고 있어 그 신비한 약효가 현대과학적인 조명을 받고 있다.

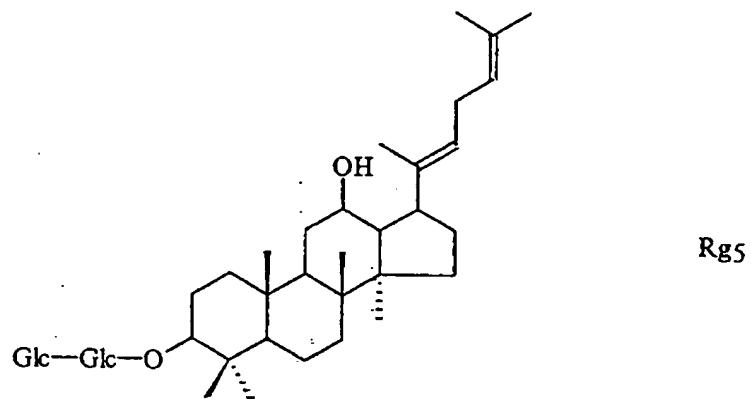
일반적으로 인삼은 재배하여 채취한 그대로의 수삼, 수삼을 상온에서 건조시킨 백삼 또는 수삼을 98 내지 100°C에서 가열처리하여 제조되는 흥삼의 형태로 이용되고 있다. 이중에서 특히 흥삼은 백삼보다 훨씬 약효가 강한 것으로 알려져 있는데, 최근들어 흥삼의 특이성분에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 성분들은 흥삼을 제조하는 과정에서 생성되는 것으로 흥삼의 우수한 약효를 설명해줄 수 있는 성분으로 평가되고 있다.

따라서 본 발명자들은 흥삼의 특이성분들을 증가시켜 인삼의 약효를 강화시킬 수 있는 수단을 연구하게 되었으며, 그 결과 인삼을 110 내지 180°C의 고온에서 0.5 내지 20 시간 동안 가열하여 처리하게 되면 기존의 수삼이나 백삼 또는 흥삼보다 약효가 훨씬 증강된 가공인삼이 제조되는 것을 확인하였다. 이러한 가공인삼에 존재하는 각종 성분들을 분리하여 그의 약효를 검증하는 과정에서 본 발명자들은 백삼이나 흥삼에는 전혀 존재하지 않거나 매우 미량으로 존재하는 성분으로 지금까지는 약효가 거의 알려지지 않았던 진세노사이드 Rg_3 및/또는 Rg_5 가 우수한 혈관이완효과를 나타냄을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명은 활성성분으로서 진세노사이드 Rg_3 및/또는 Rg_5 를 함유하는 혈관이완제 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르는 조성물에서 활성성분으로 사용되는 진세노사이드 Rg_3 및/또는 Rg_5 는 다음과 같은 구조를 갖는 사포닌 화합물로서 본 발명에서는 순수한 진세노사이드 Rg_3 및/또는 Rg_5 를 사용하거나, 또는 진세노사이드 Rg_3 및/또는 Rg_5 성분이 강화된 가공인삼 또는 그의 추출물을 사용할 수도 있다.

[화학식2]



본 발명에 따르는 조성물에서 Rg_3 및/또는 Rg_5 를 함유하는 가공 인삼추출물을 활성성분으로 사용하는 경우에 추출 물 중의 Rg_3 및/또는 Rg_5 의 함량은 적어도 10% (w/w)인 것이 바람직한데, 이는 Rg_3 및/또는 Rg_5 의 함량이 10% 미만일 경우에는 목적하는 혈관이완 효과를 충분히 얻기 위해서 너무 다량의 인삼추출물이 사용되어야 하기 때문이다.

본 발명에 따르는 조성물에서 순수한 진세노사이드 Rg_3 및/또는 Rg_5 , 또는 진세노사이드 Rg_3 및/또는 Rg_5 가 강화된 인삼추출물을 인삼 또는 인삼잎 등을 고온에서 가열처리하여 얻은 가공인삼, 또는 인삼추출물의 산가수분해 물로부터 수득할 수 있다.

진세노사이드 Rg_3 및/또는 Rg_5 가 강화된 인삼추출물은 인삼사포닌을 함유하는 파나스속 식물, 예를들면 파나스 진생(Panax ginseng), 파나스 노토진생(Panax notoginseng), 파나스 퀸퀘폴리움(Panax quinquefolium), 파나스 야포니쿠스(Panax japonicus) 등이나 또는 이들 식물의 잎, 이들 식물의 조직배양물, 또는 이들의 물 또는 저급알콜에 의한 추출물을 110 내지 180°C의 온도에서 0.5 내지 20시간 동안 가열처리하고, 수득된 가공인삼을 물 또는 적절한 유기용매, 예를들면 메탄올, 에탄올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 후에 추출물을 감압 하에 농축시키고 물에 헌탁시킨 다음, 비극성 유기용매, 예를들면 헥산, 에테르, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합용매로 추출한 후에 남은 수층을 부탄올과 같은 극성 유기용매로 추출하여 이 추출물을 크로마토그라피함으로써 Rg

Rg_3 또는 Rg_5 를 함유하는 분획을 얻거나 Rg_3 및 Rg_5 를 동시에 함유하는 분획을 수득할 수 있다. 이때 크로마토그래피를 반복수행하면 진세노사이드 Rg

Rg_3 또는 Rg_5 의 함량을 더욱 높일 수 있으며, 함량이 높아진 분획을 적절한 용매계, 예를들면 물, 저급알콜, 저급케톤, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매와 같은 용매계에서 결정화시키면 순수한 진세노사이드 Rg_3 또는 Rg_5 를 수득할 수 있다. 이 방법에서는 인삼을 가열처리하는 과정에서 인삼중에 존재하는 파나사디올계 사포닌인 진세노사이드 Ra , Rb

, Rb_2 , Rc , Rd 의 20번 탄소에 결합한 당이 떨어져 나감으로써 목적하는 진세노사이드 Rg_3 가 생성되고, Rg_3 가 계속하여 탈수반응을 일으켜 20번 위치에 이중결합이 생성됨으로써 Rg_5 가 생성된다. 경우에 따라 상기의 과정에서 가열처리하는 단계와 유기용매 추출단계를 바꾸어서 수행하거나, 고온에서 가열처리하는 대신에 온화한 조건 하에서, 예를들면 30 내지 100°C에서, 바람직하게는 70°C에서 가열하면서 산, 예를들면 염산, 질산, 과염소산 등

과 같은 짙은 광산, 또는 아세트산, 타타르산, 옥살산 등과 같은 저급 유기산으로 신처리하여 수행하는 경우에도 동일한 결과를 얻을 수 있다.

또한 상기의 과정에서 인삼 대신에 공지의 화합물인 진세노사이드 Ra, Rb₁, Rb₂, Rc, Rd 등의 성분 또는 이들의 분획을 직접 상기한 바와 같은 방법으로 가열하거나, 산가수분해하여도 동일한 결과를 얻을 수 있다.

한편, Rg₃ 및/또는 Rg₅를 함유하는 인삼추출물을 제조하는 경우에, 인삼을 가열하기 전에 유기용매, 예를들면 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 알콜용매, 에테르용매, 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 원치않는 성분인 파낙사트리올계 사포닌 성분을 제거하여 파낙사디올계 사포닌 성분을 고농도로 함유하는 분획을 얻어 이것을 상기 언급한 바와 동일한 방법으로 가열처리함으로써 Rg₃ 및/또는 Rg₅를 다양으로 함유하고 원치 않는 파낙사트리올계 사포닌 성분을 함유하지 않는 가공 파낙사디올계 사포닌 분획을 수득하여 이것을 Rg₃ 및/또는 Rg₅를 함유하는 가공인 삼추출물로 사용할 수도 있다.

본 발명에 따르는 활성성분으로서 진세노사이드 Rg₃ 및/또는 Rg₅를 함유하는 조성물은 강력한 혈관이완효과를 가지고 있어 순환기계 장애로 인한 고혈압, 동맥경화, 혈액순환장애, 당뇨병, 성기능장애, 기억력장애 등의 질환에 대한 예방 및 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다. 이러한 목적으로 임상적으로 이용시에 본 발명의 조성물은 약제학적 분야에서 통상적인 담체와 함께 배합하여 약제학적 분야에서 통상적인 제제, 예를들면 정제, 캡슐제, 트로치제, 액제, 혼탁제 등의 경구투여용 제제, 주사용 용액 또는 혼탁액, 또는 주사시에 주사용 중류수로 재조제하여 사용할 수 있는 즉시 사용형 주사용 건조분말 등의 형태인 주사용 제제, 연고제, 크림제, 액제 등의 국소적용형 제제 등의 다양한 제제로 제형화시킬 수 있다.

본 발명의 조성물에서 사용될 수 있는 담체는 약제학적 분야에서 통상적인 것으로, 예를들어 경구투여용 제제의 경우에는 결합제, 훨탁제, 봉해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 혼탁화제, 색소, 향료 등이 있으며, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제, 안정화제 등이 있고, 국소투여용 제제의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등이 있다. 이렇게 제조된 약제학적 제제는 경구적으로 투여하거나, 비경구적으로, 예를들면 정맥내, 피하, 복강내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 또한 경구투여시에 약제가 위산에 의해 분해되는 것을 방지하기 위하여 제산제를 병용하거나, 정제등의 경구투여용 고형제제를 장용피로 피복된 제제로 제형화하여 투여할 수도 있다.

본 발명에 따르는 진세노사이드 Rg₃ 및/또는 Rg₅의 인체에 대한 투여량은 체내에서의 활성성분의 흡수도, 불활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로는 성인에게 1일에 5 내지 500mg, 바람직하게는 10 내지 200mg의 양이 투여되도록 한다. 따라서, 본 발명의 조성물을 단위투여형으로 제조시에 각각의 단위투여형은 상기 언급된 유효용량 범위를 고려하여 진세노사이드 Rg

3 및/또는 Rg₅를 5 내지 500mg, 바람직하게는 10 내지 200mg 함유하도록 제형화시킬 수 있다. 이렇게 제형화된 단위투여형은 필요에 따라 약제의 투여를 감시하거나 관찰하는 전문가의 판단과 개인의 요구에 따라 전문화된 투약법을 사용하거나, 일정시간 간격으로 수회, 바람직하게는 1 내지 6회 분할 투여할 수 있다.

본 발명에 따르는 조성물의 활성성분인 진세노사이드 Rg₃ 및 Rg₅는 후술하는 실험결과로 부터 입증되는 바와 같이 혈관내 피에 대한 손상없이 혈관을 이완시키는 작용을 나타내므로 용혈이나 어독성 등의 부작용이 없을 뿐만 아니라, 실험동물에 대하여 급성독성을 나타내지 않아 안전하게 사용할 수 있다.

본 발명은 이하의 실시예 및 실험예에 의해 더욱 상세히 설명되나 본 발명이 이들에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[실시예 1]진세노사이드 Rg₃를 함유하는 인삼추출물의 제조밀폐된 용기에 수삼 100g를 넣고 130℃에서 2시간 동안 가열처리하였다. 이 가공인삼을 메탄올 200ml로 추출하여 메탄올 추출물을 얻고 메탄올을 증발시켜 제거한 후에 남은 잔사를 물 100ml에 혼탁시켜 에테르 100ml씩으로 3회 추출한 다음, 남은 수층을 수포화 부탄을 100ml씩으로 3회 추출하여 사포닌이 함유된 부탄을 추출액을 얻었다. 이 부탄을 추출액을 건조하여 에틸아세테이트/메탄올/물(20:1:1)의 혼합용매를 용출제로 사용하여 실리카겔 컬럼상에서 크로마토그라피시켜 목적하는 진세노사이드 Rg

₃를 60% 함유하는 분획 1.5g을 수득하였다.

[실시예 2]진세노사이드 Rg₅를 함유하는 인삼추출물의 제조실시예 1에서와 동일하게 실시하여 목적하는 진세노사이드 Rg₅를 50% 함유하는 분획 1.0g을 수득하였다.

[실시예 3]진세노사이드 Rg₃를 함유하는 인삼추출물의 제조건조된 미삼1kg에 메탄올 2를 가하여 수육상에서 4시간 동안 환류시켜 추출하고 여과하여 수득한 인삼 액기스를 감압하에서 건조시켰다. 수득한 시럽상의 인삼 추출물을 가압멸균기에 넣고 120℃에서 4시간 동안 가열하였다. 가열처리된 인삼 추출물을 실시예 1에서와 동일한 방

법으로 실리카겔 컬럼상에서 크로마토그라피시켜 목적하는 진세노사이드 Rg₃를 65% 함유하는 분획 20g을 분리하여 수득하였다.

[실시예 4] 진세노사이드 Rg₅를 함유하는 인삼추출물의 제조실시에 3에서와 동일하게 실시하여 목적하는 진세노사이드 Rg₅를 60% 함유하는 분획 10g을 수득하였다.

[실시예 5] 진세노사이드 Rg₃를 함유하는 인삼추출물의 제조백삼 1kg에 메탄올 2ℓ 가하여 수육상에서 4시간 동안 환류 추출하고 여과하여 수득된 인삼 액기스를 감압하에서 건조시켰다. 수득한 시럽상의 인삼 추출물을 공지된 방법[참조: 약학회지 제35권 5호, 432-437 (1991)]에 의하여 산처리하였다. 즉 인삼 추출물을 물/아세트산(1:1) 혼합용매 1ℓ에 용해 시키고 70℃에서 2시간 동안 교반하면서 가열한 다음 용매를 제거하여 얻은 산처리된 인삼 추출물을 실시에 1에서와 동일한 방법으로 실리카겔 컬럼상에서 크로마토그라피시켜 목적하는 진세노사이드 Rg₃를 72% 함유하는 분획 20g을 분리하여 수득하였다.

[실시예 6] 진세노사이드 Rg₅를 함유하는 인삼추출물의 제조실시에 5에서와 동일하게 실시하여 목적하는 진세노사이드 Rg₅를 60% 함유하는 분획 10g을 수득하였다.

[실시예 7] 가공 파낙사디올계 사포닌 분획의 제조인삼 1kg을 메탄올 200mℓ로 추출하여 메탄올 추출물을 얻고 메탄올을 증발시켜 제거한 후에 남은 잔사를 물 100mℓ에 혼탁시켜 에테르 100mℓ씩으로 3회 추출하였다. 남은수총을 에틸아세테이트 : 부탄올=10 : 1 혼합용매로 3회 추출하고, 남은 수총을 다시 부탄올 100mℓ로 3회 추출하여 파낙사디올계 사포닌 분획을 얻었다. 이 파낙사디올계 사포닌 분획을 실시에 1에서와 동일한 방법으로 130℃에서 3시간 동안 가열처리하여 가공 파낙사디올계 사포닌 분획 약 40g을 수득하였다.

[실시예 8] 진세노사이드 Rg₃의 제조상기 실시에 3에서 수득한 진세노사이드 Rg₃ 함유 분획 1g을 에틸아세테이트/메탄올/물(20:1:1)의 혼합용매를 용출제로 사용하여 실시에 1에서와 동일한 방법으로 실리카겔 컬럼상에서 크로마토그라피를 반복 수행하여 목적하는 진세노사이드 Rg₃를 92% 함유하는 분획 500mg을 수득하였다. 수득된 진세노사이드 Rg₃ 함유 분획을 메탄올 및 에틸아세테이트 혼합용매로부터 재결정화시켜 목적하는 진세노사이드 Rg₃ 약 400mg을 수득하였다.

수득한 진세노사이드 Rg₃는 문헌[참조: 일본약학잡지, 103(6), 612-622 (1983) 또는 약학회지 제35권 5호, 432-437 (1991)]에 공지된 것과 일치하는 ¹³C-NMR 스펙트럼 및 질량 스펙트럼을 나타낸다. 즉 수득한 진세노사이드 Rg₃ 약 10mg을 피리딘-d₅(99.5%) 600μℓ에 용해시키고 탄소핵자기공명스펙트럼을 측정하면 특징적인 Rg₃의 피크를 나타낸다. 또한 진세노사이드 Rg₃의 질량 스펙트럼(FAB+)은 785([M+H]⁺)나 807([M+Na]⁺)의 분자이온 피크를 나타낸다.

[실시예 9] 진세노사이드 Rg₅의 제조상기 실시에 4에서 수득한 진세노사이드 Rg₅ 함유 분획 1g에 대해 실시에 8에서와 동일하게 실시하여 Rg₅를 약 90% 함유하는 분획 200mg 수득하였으며, 수득된 진세노사이드 Rg₅ 함유 분획을 메탄올 및 에틸아세테이트 혼합용매로부터 재결정화시켜 목적하는 진세노사이드 Rg₅ 약 150mg을 수득하였다.

수득한 진세노사이드 Rg₅는 다음과 같은 이화학적 특징을 나타낸다.

MS(FAB+, m/z): 789([M+NA]⁺), 805([M+K]⁺)¹³C-NMR (ppm, 피리딘-d₅): δ 13.0, 16.0, 16.5, 16.6, 17.0, 17.8, 18.5, 25.8, 26.7, 27.0, 27.4, 28.1, 32.3, 32.6, 35.3, 37.0, 39.2, 39.7, 40.2, 50.5, 50.9, 51.2, 56.4, 62.6, 62.8, 71.4, 72.4, 72.6, 77.2, 77.9, 78.1, 78.3, 78.3, 83.5, 88.9, 105.2, 106.1, 123.5, 124.6, 131.2, 140.2

[실험에 1] [진세노사이드 Rg₃ 및 Rg₅의 혈관이완작용] 혈관의 내피는 혈류 및 혈관의 긴장도를 조절하고 혈소판 응집을 억제하는 등 체내 항상성 유지에 매우 중요한 역할을 하고 있다. 특히 혈관의 내피는 EDRF(endoth

elium-derived relaxing factor, 내피유리인자), 즉 일산화질소(NO)를 유리하며, 일산화질소는 혈관평활근에 작용하여 가용성 구아닐레이트 사이클라제를 활성화하여 조직내 사이클릭 GMP를 증가시켜 혈관을 이완시키는 것으로 알려져 있다. 고혈압, 고콜레스테롤혈증 등의 순환기계 질환에 의하여 내피의 기능이 손상되면 일산화질소의

유리가 감소되어 정상적인 혈관조절기능이 손실된다. 그러나 대부분의 사포닌 성분들은 내피세포까지 파괴하면서 혈관이완작용을 나타내므로 용혈이나 어독성등의 심각한 부작용을 나타내므로 바람직하지 못하였다. 따라서 내피에 대한 손상이 없이 혈관에 대해 이완작용을 나타내는 성분이 필요하다.

본 발명자들은 진세노사이드 Rg_3 및 Rg_5 가 통상의 사포닌 성분과는 달리 강력한 내피의존성 혈관이완작용을 나타내는 것을 확인하였으며, 이하에서는 이를 실험적으로 입증한다.

1. 실험방법

300 내지 400g의 스프라그-도울리(Sprague-Dowley: SD) 랫트의 흉부 대동맥을 신속하게 적출하여 크렐스-링거-중탄산나트륨 용액(대조용액, NaCl 118.3; KCl 4.7; MgSO₄ 1.2; KH₂PO₄ 1.2; CaCl₂ 2.5; NaHCO₃ 25; CaEDTA 0.016; 포도당 11.1 mM)에 옮겼다. 내부의 혈액과 혈관 주위의 지방 및 결합조직을 제거하고 약 2 내지 3mm 길이로 대동맥환을 만들어 pH 7.4인 대조용액이 채워진 25mL 장기 챔버에 수직으로 현수하였다. 일부의 대동맥환은 내부에 핀셋을 넣어 종이타올위에서 7 내지 8회 굴려서 내피세포를 제거한 혈관으로 사용하였다. 대동맥환의 하부는 장기챔버에 고정하고 상부는 등자를 통하여 등척성장력의 기록을 위해 트랜스듀서 커플러(transducer coupler)에 연결하였다.

장기챔버에 페닐에프린 10^{-6} M을 가하여 안정된 수축을 나타내는 대동맥환에 진세노사이드 Rg_3 또는 Rg_5 의 디메틸설록사이드 용액을 단독으로, 또는 매틸렌블루(MB) 10^{-6} M 또는 L-니트로알기닌(L-NNA) 10^{-6} M과 함께 가하여 혈관이완작용을 관찰하였다. 페닐에프린 10^{-6} M에 의한 수축도를 100%로 하고 이것을 기준으로 진세노사이드 Rg_3 또는 Rg_5 에 의한 이완도를 %로 나타내었다.

2. 실험결과

제1도 및 4도에 도시된 바와 같이, 진세노사이드 Rg_3 및 Rg_5 는 각각 내피에 존재하는 혈관을 농도의존적으로 이완시켰다. 그러나 내피를 제거한 혈관에 대해서는 작용을 나타내지 않았고, 일산화질소 합성효소의 저해제인 L-니트로알기닌(L-NLA) 및 가용성 구아닐레이트 사이클라제 억제제인 메틸렌블루(MB)에 의해 진세노사이드 Rg_3 또는 Rg_5 의 혈관이완작용은 유의성있게 억제되었다.

이러한 결과로 부터 진세노사이드 Rg_3 및 Rg_5 는 내피세포가 있는 혈관에서만 혈관이완작용을 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 진세노사이드 Rg_3 및 Rg_5 는 내피세포까지 파괴하는 다른 사포닌 성분과는 달리 용혈작용이나 어독성 등의 부작용을 나타내지 않는 안전한 의약성분임을 알 수 있었다.

[실험예 2][가공 사포닌 분획의 혈관이완작용]1. 실험방법

전술한 실시예 7에서 수득한 가공 파낙사디올계 사포닌 분획에 대하여 실험예 1의 실험방법과 동일한 방법으로 혈관이완작용을 측정하였다.

2. 실험결과

제2도에 도시된 바와 같이 가공 파낙사디올계 사포닌 분획은 내피기 존재하는 혈관을 농도의존적으로 이완시켰다. 그러나 내피를 제거한 혈관에 대해서는 작용을 나타태지 않았고 일산화질소 합성효소의 저해제인 L-니트로알기닌(L-NLA) 및 가용성 구아닐레이트 사이클라제 억제제인 메틸렌블루에 의해 혈관이완작용은 유의성있게 억제되었다.

이러한 결과로부터 실시예 7에서 수득된 가공 파낙사디올계 분획은 내피세포가 있는 혈관에서만 혈관이완작용을 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 가공 파낙사디올계 분획은 내피세포까지 파괴하는 다른 사포닌 성분과는 달리 용혈작용이나 어독성 등의 부작용을 나타내지 않는 안전한 의약성분임을 알 수 있었다.

[실험예 3][진세노사이드 Rg₃의 세포독성 실험]1. 실험방법 :

M199 배지에서 배양한 HUVEC(사람의 제대정액 내피세포)을 세포 20000개/180 μ l의 농도가 되도록 생리식염수에 혼탁시켜 세포현탁액을 만들어 96-웰 플레이트에 웰당 180 μ l씩 가하고 용매인 디메틸설폭사이드와 디메틸설폭사이드에 용해된 Rg₃를 20 μ l씩 가한 다음, 37°C, 5% 이산화탄소의 세포배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 이어서 인삼염완총액에 용해시킨 MTT[3-(4,5-dimethyl-thiazol-2'-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 용액(2mg/ml을 50 μ l씩 가하고 다시 4시간 동안 상기와 동일한 조건하에서 배양한 후, 상등액을 제거하고 디메틸설폭사이드를 200 μ l 가하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도값을 세포수로 환산하여 용매인 디메틸설폭사이드이 경우와 Rg₃

의 경우에 세포성장을 50% 억제시키는 농도인 IC₅₀ 값을 구하여 세포독성의 지표로 하였다.

2. 실험결과 :

디메틸설폭사이드의 경우(대조군)는 0.6%부터 세포독성을 보이기 시작하여 6%에서는 100% 세포성장을 억제하여 용량-반응성을 보였으며, IC₅₀

은 18.4 μ l/ml 이었고, Rg₃

는 1 내지 100 μ g/ml 농도 범위에서 디메틸설폭사이드와 같은 양상을 보였으며, IC₅₀은 26.7 μ g/ml로서, 오히려 약간 높은 값을 보여 세포독성이 적은 경향을 나타냈다. 즉 Rg₃

투여군은 대조군보다 세포의 생존율이 더 높아 오히려 세포성장 촉진효과가 있는 것으로 나타났다 (제3도).

[실험예 4][진세노사이드 Rg₅의 세포독성 실험]1. 실험방법 :

M199 배지에서 배양한 HUVEC(사람의 제대정액 내피세포)을 세포 20000개/180 μ l의 농도가 되도록 생리식염수에 혼탁시켜 세포현탁액을 만들어 96-웰 플레이트에 웰당 180 μ l씩 가하고 용매인 정제수와 정제수에 용해된 Rg₅를 20 μ l씩 가한 다음, 37°C, 5% 이산화탄소의 세포배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 이어서 인삼염완총액에 용해시킨 MTT[3-(4,5-dimethyl-thiazol-2'-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 용액(2mg/ml)을 50 μ l씩 가하고 다시 4시간 동안 상기와 동일한 조건하에서 배양한 후, 상등액을 제거하고 디메틸설폭사이드를 200 μ l 가하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

2. 실험결과 :

제5도에 나타낸 바와 같이, 진세노사이드 Rg₅투여군은 비록 통계적인 유의성은 없었으나 대조군에 비하여 세포 성장이 더욱 활발하였다. 따라서, 진세노사이드 Rg₅

는 세포에 대한 독성이 없음을 알 수 있었다.

[조성률에]이하에서, 활성성분으로 사용된 Rg₃는 Rg₅, Rg₃ 및 Rg₅에 의해 대체될 수 있고, Rg₃를 함유하는 분획은 Rg₅, Rg₃ 및 Rg₅를 함유하는 분획에 의해 대체될 수 있다.

[조성예 1]

옥수수 전분 44g

결정성 셀룰로오즈 40g

카르복시메틸셀룰로오즈칼슘 5g

마그네슘스테아레이트 1g

실시예 1에서 수득한 분획 10g

계 100g상기한 처방에 따라 각 성분을 균일하게 혼합한 다음 타정기에서 압축 성형하여 1정 500mg의 정제를 제조하였다. 이 정제 1정에는 실시예 1에서 수득한 분획 50mg이 함유되어 있다. 성인 1일 3 내지 10정을 수회에 나누어 복용한다.

[조성예 2]

결정성 셀룰로오즈 34.5g

10% 하이드록시프로필셀룰로오즈 에탄올용액 50g

카르복시메틸셀룰로오즈칼슘 5g

마그네슘스테아레이트 0.5g

실시예 5에서 수득한 분획 10g

계 100g

상기한 처방에 따라 결정성 셀룰로오즈, 10% 하이드록시프로필셀룰로오즈 에탄올용액 및 실시예 5에서 수득한 분획을 유일하게 혼합하여 통상의 방법에 따라 조립기를 이용하여 건조시키고 분쇄한 후 카르복시메틸셀룰로오즈 칼슘 및 마그네슘스테아레이트를 혼합하여 타정기에서 압축 성형하여 1정 500mg의 정제를 제조하였다. 이 정제 1정에는 실시예 5에서 수득한 분획 50mg이 함유되어 있다. 성인 1일 3 내지 10정을 수회에 나누어 복용한다.

[조성예 3]

주사용증류수

86.5g

에탄올

5g

대두인지질

2.5g

글리세린

5g

실시예 8에서 수득한 Rg_3

1g

계 100g

상기 처방에 따라 실시예 8에서 수득한 Rg_3 를 에탄올 및 대두인지질에 용해시키고, 여기에 주사용 증류수와 글리세린의 용액을 가하여 유화시켜 주사제를 제조하였다.

[조성예 4]

① 염산 피리독신 300mg

②

니코틴산아미드 1g

③

칼슘판토테네이트 1g

④

리보플라빈 200mg

⑤

시트르산 30g

⑥

실시예 1에서 수득한 분획 20g

음양곽 액기스 200mg

⑦

물을 가하여 총 10ℓ로 한다.

상기 처방에 따라 성분

내지

⑧

을

에 용해시켜 액제를 제조하였다. 이 액제 100ml는 실시예 1에서 얻은 분획 200mg을 함유한다.

[조성예 5]

결정성 셀룰로오즈 440g

마그네슘스테아레이트 10g

실시예 8에서 수득한 Rg₃ 50g

계 500g

상기한 처방에 따라 모든 성분들을 균일하게 혼합하여 통상의 방법에 따라 조립기를 이용하여 조립하고 총전기에 충전하여 캡슐당 500mg의 캡슐제를 제조하였다. 이 캡슐제 1캡슐에는 Rg₃

50mg이 함유되어 있다. 성인 1일 3 내지 10캡슐을 수회에 나누어 복용한다.

(57) 청구의 범위

청구항1

활성성분으로서 진세노사이드 Rg₃ 및/또는 Rg₅를 함유하는 혈관이완제 조성물.

청구항2

제1항에 있어서, 활성성분인 진세노사이드 Rg₃ 및/또는 Rg₅가 순수한 Rg₃ 및/또는 Rg₅임을 특징으로 하는 혈관이완제 조성물.

청구항3

제1항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 단위투여형으로 제형화됨을 특징으로 하는 혈관이완제 조성물.

청구항4

제3항에 있어서, 단위투여형 약제학적 제형이 정제, 경질 또는 연질캡슐제, 과립제, 액제, 혼탁제, 주사용 용액 또는 혼탁액임을 특징으로 하는 혈관이완제 조성물.

청구항5

제4항에 있어서, 단위투여형이 진세노사이드 Rg₃ 및/또는 Rg₅를 10 내지 500mg 함유하도록 제형화됨을 특징으로 하는 혈관이완제 조성물.

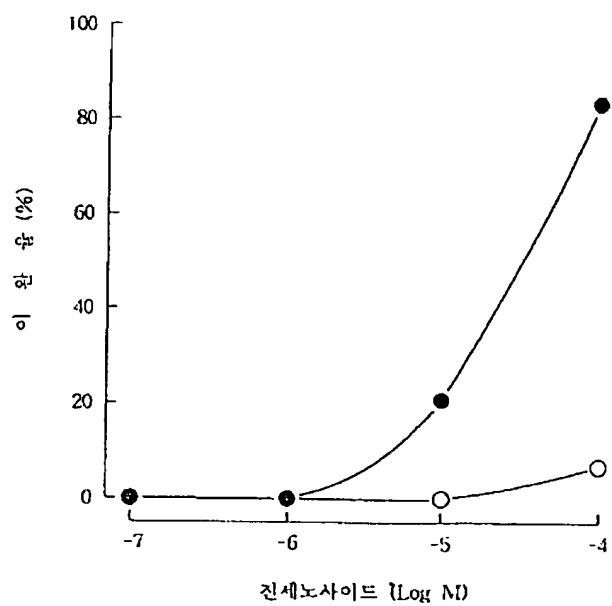
청구항6

제1항에 있어서, 활성성분인 진세노사이드 Rg₃ 및/또는 Rg₅가 Rg₃ 및/또는 Rg₅를 10% 이상 함유하는 인삼 추출물임을 특징으로 하는 혈관이완제 조성물.

도면

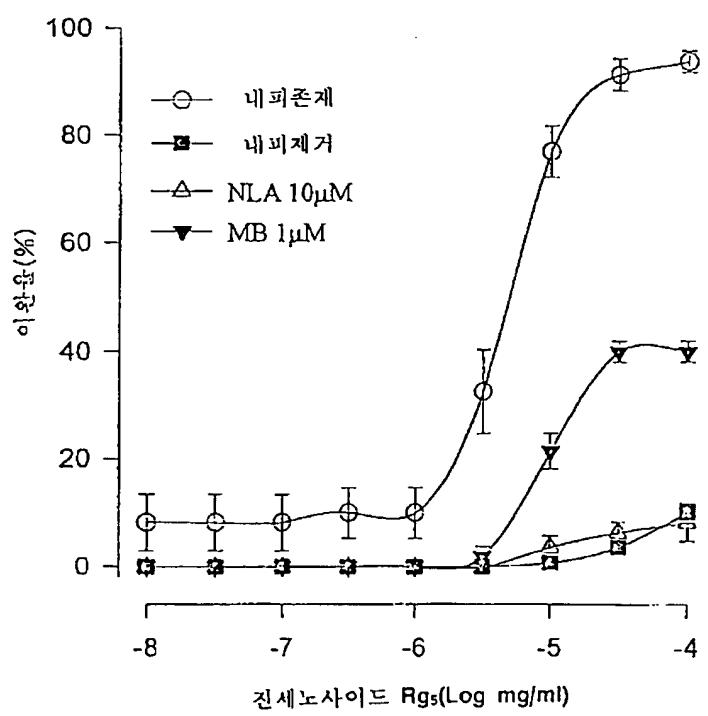
도면1

도면2



도면3

도면4



도면5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.